

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. med. et phil. G. Wolf-Heidegger
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. R. Schenk

Der Einfluß von Cytostatica auf die larvale Entwicklung der Myotome von *Triton alpestris*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Brian Spindler

—
von Basel



19

65

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. SCHENK

Tag der Promotion: 1. Juni 1965



Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel, Schweiz
Vorsteher: Prof. Dr. med. et phil. G. Wolf-Heidegger

DER EINFLUSS VON CYTOSTATICA AUF DIE
LARVALE ENTWICKLUNG DER MYOTOME VON
*TRITON ALPESTRIS**

Von BRIAN SPINDLER

Inhalt

I. Einleitung	215
II. Material und Methodik	216
III. Ergebnisse	217
A. Allgemeines zur Entwicklung und Differenzierung der Myotome	217
B. Versuche mit mitoseblockierenden Substanzen	223
IV. Diskussion	229
A. Die differenzierungshemmende und toxische Wirkung des Stilboestrols	230
B. Mitoseblock	232
Zusammenfassung	237
Literaturverzeichnis	238

I. Einleitung

Mitoseblockierende Substanzen haben sich für das Studium embryonaler Wachstums- und Differenzierungsvorgänge an Amphibien in verschiedener Hinsicht als aufschlußreich erwiesen, gestatten sie doch, durch die Drosselung oder Unterbindung der Zellvermehrung in rasch wachsenden Organanlagen charakteristische Schädigungsmuster herbeizuführen. So haben *Töndury* [1941–1956], *Schenk* [1950, 1952, 1956], *Morger* [1956] u. a. in einer Reihe von Arbeiten den Einfluß verschiedener sogenannter Cytostatica auf Furchung, Gastrulation und Neurulation sowie auf die larvale Entwicklung der Organe von *Triton alpestris* untersucht. Im Vordergrund stehen die Befunde an den Organanlagen mit intensiver Proliferation, wie Neuralrohr, Augenanlagen und Extremitätenknospen. Unter den geprüften Substanzen befinden sich solche, welche die Mitose im Stadium der Metaphase blockieren (Colchicinderivate, Oestrogene, Stilboestrol) und Vertreter von Stoffgruppen, welche die Zellvermehrung in der Interphase arretieren (Nitrogen mustard, Myleran, Triäthylenmelamin). Alle diese Stoffe erwiesen sich – neben ihrem bekannten Effekt auf den Mitoseablauf – auch als wirksam auf die Zelldifferenzierung. Es sei hier ganz besonders auf die hohe Empfindlichkeit der Neuroblasten hingewiesen, die innerhalb weniger Tage nach der Behandlung zugrunde gehen.

* Die Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. R. Schenk durchgeführt.

Im Anschluß an *Schenk* [1950] beschrieb *Morger* [1956] den Einfluß des Stilboestrols auf Wachstum und Differenzierung des Neuralrohrs sowie der Retina und berichtete über Schädigungen in den Muskelanlagen. Er tat dies relativ kurz, doch veranlaßten uns seine makroskopischen Beobachtungen über Lähmungserscheinungen an den Versuchskeimen, seine Photographien geschädigter Myotome und seine Beschreibung der Degenerationserscheinungen, eine Reihe von Experimenten speziell auf die Muskelentwicklung auszurichten. Wir stellten uns dabei insbesondere die Frage, ob sich nicht auch innerhalb der Muskulatur die cytostatische Wirkung des Stilboestrols nachweisen läßt (was von *Morger* verneint wurde) und ob sich mit Hilfe des zu erwartenden Mitosestops etwas über die Entstehung der Vielkernigkeit der Skelettmuskelzellen aussagen ließe.

Eine derartige Untersuchung schien uns auch deshalb berechtigt, weil in der Literatur mit wenigen Ausnahmen – weder von der pharmakologischen noch von der entwicklungsphysiologischen Seite her – viel auf die Frage der Beeinflussung der Muskelentwicklung eingegangen wird. Das Problem der Entstehung der Vielkernigkeit quergestreifter Muskelzellen hingegen beschäftigt die Forscher schon recht lange und ist Gegenstand verschiedener Theorien. Im Rahmen von Untersuchungen, die auf die Zusammenhänge zwischen Zellkern und Produktion kontraktiler Proteine, wie Actin, Myosin und verwandter Stoffe, ausgerichtet sind, haben insbesondere *Holtzer*, *Stockdale*, *Ogawa* u. a. die Frage der Kernvermehrung in den Skelettmuskelzellen mit modernen Methoden angegangen und sind zu interessanten Ergebnissen und Überlegungen gekommen. Unsere Arbeit gewinnt dadurch an Aktualität; besonders interessant dürfte es sein, zu sehen, ob sich gewisse neue Resultate auch im Amphibienexperiment erreichen oder bestätigen lassen.

II. Material und Methodik

Die Versuche wurden an Keimen von *Triton alpestris* ausgeführt, die unmittelbar nach der Ablage oder kurz vor Versuchsbeginn aus der Gallerthülle befreit wurden. Die Aufzucht der Keime erfolgte in frischem Brunnenwasser. In einer Reihe von Vorversuchen wurden verschiedene Substanzen in wechselnden Konzentrationen und verschiedener Behandlungsdauer auf ihre mitoseblockierende Wirkung geprüft, darunter Colcemid 1:50 000, Triäthylenmelamin (TEM) 1:10 000, Demecolcin 1:2500, 1:5000, 1:10 000 und Stilboestrol 1:25 000, 1:50 000, 1:100 000 und 1:200 000. Unter den Substanzen, welche einen typischen Metaphaseblock erzeugen, erwies sich – wie bei *Schenk* und *Morger* – das Stilboestrol als am besten geeignet. Von der Firma Hoffmann-La Roche Basel wurde uns freundlicherweise unter der Bezeichnung Ro-5545/3 ein wasserlösliches Präparat zur Verfügung gestellt, das sich in einer Konzentration von 1:200 000 für unsere Zwecke gut bewährte.

Die Versuche wurden mit Keimen am 1., 2., 5., 9. und 10. Entwicklungstag durchgeführt; die Verweildauer in der Stilboestrolösung betrug jeweils 48 Stunden. Unmittelbar nach der Behandlung wurden die Keime fixiert. Ergänzend wurden zwei Gruppen im Alter von 8 und 10 Tagen während 96 Stunden behandelt. Triäthylenmelamin kam in einer Konzentration von 1:10 000 zur Anwendung, die Expositionszeit betrug 24 und 48 Stunden, ohne oder mit einer Erholungsphase in Brunnenwasser von 24 oder 96 Stunden. Parallel mit den Versuchsserien wurden Kontrollgruppen aufgezogen und in entsprechenden Zeitabständen fixiert.

Mit Rücksicht auf die in Aussicht genommenen Färbemethoden wurden sämtliche Keime in Carnoy fixiert, in Paraffin eingebettet und lückenlos in Serien ge-

schnitten (Schnittdicke 10 μ). Die jüngsten Keime (bis zum 4. Tag) wurden sagittal, alle übrigen frontal geschnitten. Als Färbungen wurden angewandt: Methylgrün-Pyronin, PAS-Reaktion nach *Hotchkiss*, Azan und Feulgen-Pikroblauschwarz.

Die Methylgrün-Pyroninfärbung wurde nach der Vorschrift von *Schenk* durchgeführt: Die Lösung wird zubereitet, indem man auf 100 ml Michaelis Puffer (pH 4,9) 200 mg Pyronin GS (Chroma AG Stuttgart) und 150 mg Methylgrün beigibt. Das Ergebnis ist weitgehend von der Wahl des Farbstoffs abhängig. Das Pyronin GS weist eine relativ gute Spezifität auf Ribonucleinsäure (RNS) auf und wird bei der Entwässerung in Alkohol nur wenig herausgelöst. Das Methylgrün (*Geigy*) wird vor der Herstellung der Farblösung zur Extraktion des Methylvioletts mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Färbung ist spezifisch auf Nucleoproteine. Die Desoxyribonucleinsäure (DNS) wird mit Methylgrün angefärbt. Die Färbung RNS-haltiger Proteine ist weniger spezifisch und muß jeweils durch Behandlung mit Ribonuclease kontrolliert werden.

Die Eignung der verschiedenen Färbemethoden für die Darstellung der uns interessierenden Einzelheiten in der Muskeldifferenzierung wird im Rahmen der Befunde an den Normalkeimen besprochen. Für die quantitative Bewertung wurde neben dem Auszählen der Kerne und der Mitosestadien das Zeiß-Integrationsokular I herangezogen. Dieses von *Hennig* [1958] für das Punktzählverfahren entwickelte Okular erlaubte es, den prozentualen Anteil der Kernvolumina am Gesamtvolumen bestimmter Myotome oder der ganzen Muskulatur zu bestimmen und gab damit einen Einblick in die Kern-Plasmarelation.

III. Ergebnisse

A. Allgemeines zur Entwicklung und Differenzierung der Myotome

Die Myoblasten für die genuine Rückenmuskulatur der Keime von *Triton alpestris* sind – wie bei allen Vertebraten – im Myotom der Ursegmente lokalisiert. Sie liegen dort in einem epithelialen Verbande. Durch Streckung der Zellen in der Körperachse kommt es im Verlaufe der Entwicklung zu einer streng segmentalen Anordnung der Myoblasten in paralleler Lage, eine Entwicklungsstufe, die um den 4. Tag erreicht wird.

Im Anschluß daran setzt die Differenzierung der Muskelzellen ein, die gekennzeichnet ist

1. durch Veränderungen im Cytoplasma der Myoblasten, besonders durch das Auftreten der Myofibrillen,
2. durch eine deutliche Kernvermehrung innerhalb der einzelnen Zellen (Abb. 1 und 2).

Solange die Zellen noch keine Myofibrillen aufweisen, werden sie – unabhängig von ihrer Kernzahl und Form – als Myoblasten bezeichnet. Sobald Myofibrillen auftreten, ist man berechtigt, von Myocyten (Muskelzellen oder Muskelfasern) zu sprechen. Bei *Triton alpestris* werden die Myofibrillen um den 5. Tag sichtbar, was mit den

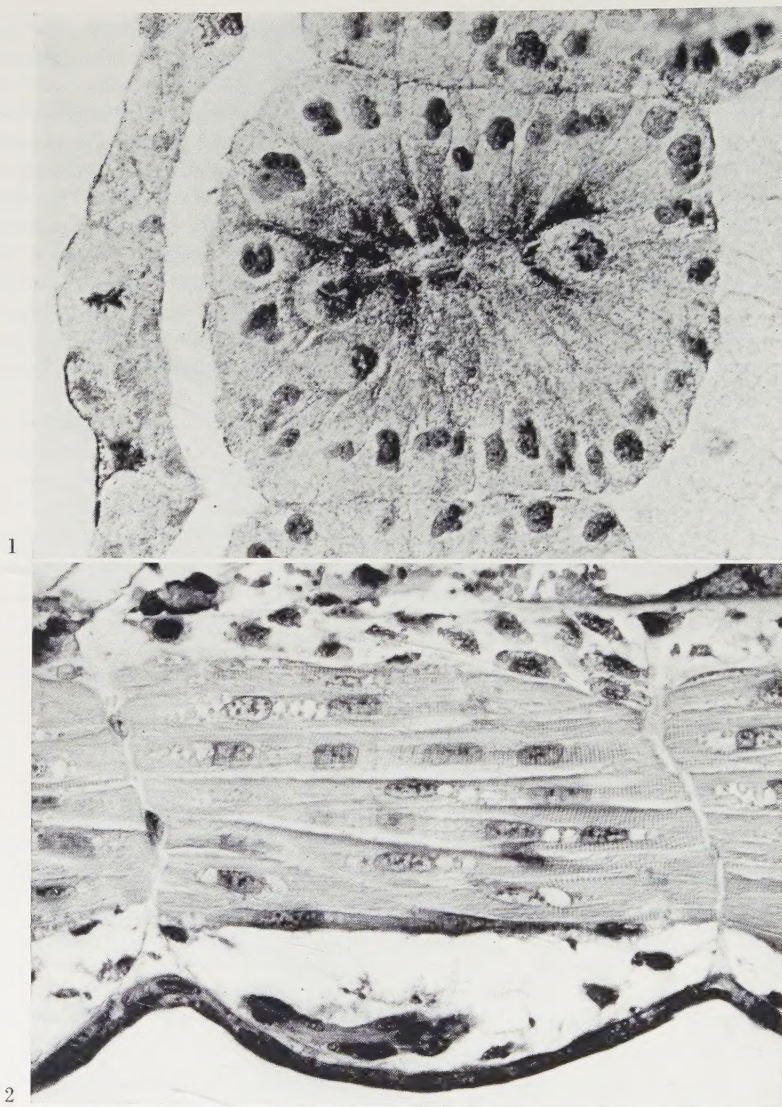


Abb. 1. 3 Tage alter Tritonkeim. Einkernige Myoblasten in epithelialem Verband. Mitotische Zellvermehrung (Methylgrün-Pyronin).

Abb. 2. 9 Tage alter Keim. Vollentwickeltes Myotom mit deutlich quergestreiften Myofibrillen in den mehrkernigen Muskelzellen.

Befunden von *Ogawa* [1962] übereinstimmt, der bei *Triturus pyrrhogaster* festgestellt hat, daß sich Actin und Myosin erst 132 bis 176 Stunden nach der Befruchtung nachweisen lassen.

Es ist weiter auffallend, daß es bei den Myoblasten und Myocyten im Laufe der Entwicklung zu einer deutlichen Kernvermehrung kommt. Namentlich diese, aber auch die cytoplasmatische Differenzierung der Keime gleichen Alters, ist in den vordern Myotomen weiter fortgeschritten als in den hintern. Dieses Phänomen wird als cranio-caudales Entwicklungsgefälle bezeichnet (s. auch Tabelle I).

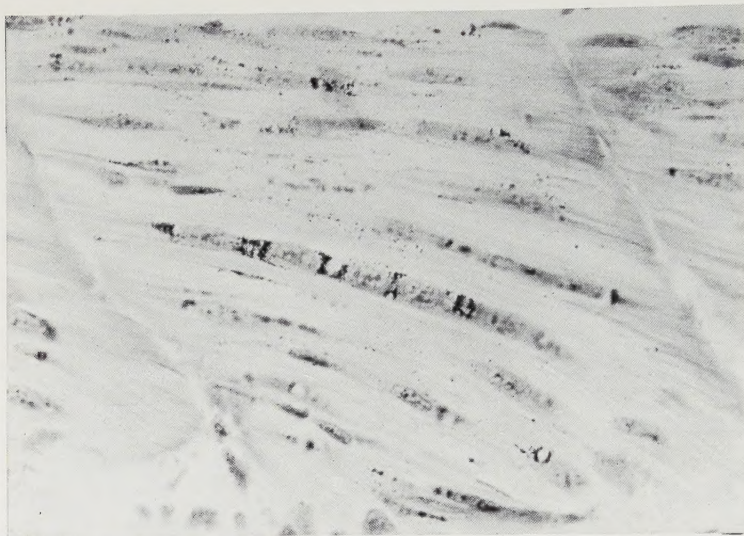
Die Beurteilung der Differenzierung wird durch histochemische Färbemethoden erleichtert. In der Methylgrün-Pyroninfärbung erscheint bei den Myoblasten das ganze Cytoplasma rot granuliert. Dies beruht auf seinem hohen Gehalt an RNS. Bei den Myocyten zeigen die metaplasmatischen Strukturen keine Affinität zum Pyronin. Die Myofibrillen liegen zylindermantelartig um das axiale Sarkoplasma, in welchem die Kappen der Kernpole besonders stark angefärbt sind. Zwischen den Kernen, die axial in Längsrichtung hintereinander liegen, finden sich die Dotterschollen und Vakuolen, welche umgeben sind von RNS-reichen Granula sowie von Pigmentkörnern (Abb. 3). Im Alter von 14 Tagen sind praktisch alle Dotterschollen und Vakuolen verschwunden.

Die PAS-Färbung ist in sehr jungen Stadien stark positiv durch ihre Affinität zu den Polysacchariden des Dotters. Nach dem Auftreten der Querstreifung gibt auch der Q-Streifen in den Myofibrillen eine deutliche PAS-Reaktion. Es ist zu erwähnen, daß der genauen Lokalisation Grenzen gesetzt sind, bedingt durch die sogenannte Alkoholflucht, durch welche es oft zu einer einseitigen oder schlierigen Verteilung des Farbstoffs kommt (Abb. 4). Die große Bedeutung der PAS-Färbung lag für uns darin, daß sie durch die Anfärbung der Myofibrillen das Erkennen junger Muskelzellen erleichtert.

Als weiteres färberisches Hilfsmittel wurde noch die Feulgenreaktion kombiniert mit Pikroblauschwarz verwendet. Sie stellt die Muskelzellen durch die Anfärbung der Zellgrenzen ebenfalls sehr kontrastreich dar. Um genaue Aussagen über den DNS-Gehalt der Kerne machen zu können, müßten histophotometrische Messungen verwendet werden; größere Differenzen im Sinne einer Polyploidie oder Haploidie sind jedoch ohne weiteres erkennbar.

Zur Frage der Kernvermehrung ist zu sagen, daß eine Erfassung der absoluten Kernzahlen in Schnittserien technisch äußerst schwierig ist (Vermeidung von Doppelzählungen). Die durchschnittliche Kernzahl in genau geschnittenen Zellen beträgt im Alter von 3–4 Tagen 1, im Alter von 5–7 Tagen 2, im Alter von 8–10 Tagen 3. Die höchste Kernzahl, die wir als Ausnahme gefunden haben, war 7. Es ist

3



4



Abb. 3. Typische 5kernige Muskelzelle mit axial gelegenen Kernen, Dotterschollen und RNS-reichen Granula. Die Myofibrillen sind peripher angeordnet. Methylgrün-Pyroninfärbung.

Abb. 4. 10 Tage alter Keim mit deutlicher Mitose innerhalb des Myotoms. PAS-Färbung, einseitige schlierige Verteilung des PAS-positiven Materials infolge Alkoholfixiert.

noch zu bemerken, daß jeweils ein Unterschied in der durchschnittlichen Kernzahl zwischen den Myocyten caudaler und cranialer Myotome besteht.

Für die Beurteilung der Muskeldifferenzierung und des Schädigungsmusters der in unsern Versuchen geprüften Substanzen erwies sich die volumenmäßige Erfassung der Kern-Plasmarelation als aufschlußreich. Mit Hilfe des Zeiß-Integrationsokulars I ist es möglich, den prozentualen Volumenanteil der Muskelzellkerne am Gesamtvolumen der Myotome zu erfassen. Führt man dabei zwei Bestimmungen pro Schnitt durch, wobei in der ersten nur die vordern, in der zweiten nur die hintern Myotome ausgewertet werden, so erhält man eine quantitative Bestätigung des bereits erwähnten cranio-caudalen Entwicklungsgefälles (Tabelle I). Ferner nimmt mit zunehmendem Alter, also mit steigender Differenzierung, der Volumenanteil der Kerne im Verhältnis zum gesamten Zelleib ab. Diese Tatsache ist auf die enorme Zunahme der kontraktilen Elemente zurückzuführen.

Tabelle I. Prozentualer Anteil des Kernvolumens am Gesamtvolumen der Myotome, gesondert bestimmt für vordere und hintere Myotome. (Die Werte entsprechen einer Auszählung von 250 Testpunkten, Prozentzahlen und statistische Fehler wurden nach Nomogramm ermittelt)

Alter (Tage)	Volumen% Kerne	
	Vordere Myotome	Hintere Myotome
5	14,4 % ($\pm 1,5$)	26,8 % ($\pm 1,9$)
7	12,5 % ($\pm 1,4$)	24,4 % ($\pm 1,9$)
8	11,6 % ($\pm 1,3$)	23,2 % ($\pm 1,8$)
11	8,8 % ($\pm 1,2$)	19,6 % ($\pm 1,7$)
12	7,6 % ($\pm 1,1$)	16,4 % ($\pm 1,6$)
14	4,8 % ($\pm 0,9$)	12,4 % ($\pm 1,4$)

Es wurden ferner Auszählungen der Mitosen in allen Keimen vorgenommen. Gezählt wurden in ältern Stadien nur Mitosen, die eindeutig innerhalb eines Myotoms liegen und allseitig von myofibrillenhaltigen Zellbezirken umgeben sind, in jüngern Stadien nur Mitosen von sichern Myoblastenkernen. Als Einschränkung ist dennoch zu sagen, daß es bei ältern Stadien manchmal kaum möglich ist, zu erkennen, ob es sich um Teilungsstadien von Myocytenkernen, von Myoblastenkernen im Sinne undifferenzierter Stammzellen, oder gar um Kerne von Bindegewebszellen oder Endothelzellen einsprossender Kapillaren handelt. Um einen Hinweis auf die allgemeine Mitoseaktivität des betreffenden Keims zu erhalten, haben wir jeweils auch die Mitosestadien der Retinaanlage ausgezählt. Bei den jüngsten Keimen war dies nicht nötig, weil keine Differenzen bestehen (Tabelle II).

Tabelle II. Zahl der Mitosen in der Muskulatur und – soweit notwendig – in der Retina in Abhängigkeit vom Alter der Keime

Alter bei Fixation	Mitosen (Muskulatur)	Mitosen (Retina)
3 Tage	183	nicht bestimmt
4 Tage	286	nicht bestimmt
5 Tage	9	342
7 Tage	19	349
8 Tage	25	359
9 Tage	27	361
10 Tage	83	445
11 Tage	70	391
12 Tage	55	384
14 Tage	11	87

Die Zahl der Mitosefiguren innerhalb der Muskulatur ist also anfänglich sehr hoch, sinkt um den 5. Tag, gleichzeitig mit dem Auftreten der Myofibrillen, rapid ab, steigt dann allmählich wieder an und sinkt um den 12. Tag erneut ab. Die hohe mitotische Aktivität der jüngsten Keime (3 und 4 Tage alt) ist Ausdruck der Vermehrung der Myoblasten. Mit dem Auftreten der Myofibrillen sinkt die Mitosezahl ab, ohne aber gänzlich zu verschwinden. Erst um den 14. Tag, mit dem Schwinden der Dotterreserven, hört die gesamte mitotische Vermehrung der Zellkerne auf. Es handelt sich dabei um einen Hungereffekt.

Wir haben den prozentualen Anteil der verschiedenen Phasen im Ablauf der Mitosen in der Retinaanlage geprüft und dabei im Durchschnitt folgendes Verhältnis gefunden: 16 % Prophasen, 51 % Metaphasen, 21 % Anaphasen und 12 % Telophasen. Dieses Verhältnis gilt auch für die Myoblastenkerne in den jüngsten Stadien. Bei den älteren Stadien sind die Mitosefiguren innerhalb der Muskulatur zu spärlich, als daß wir dort eine ähnliche Auszählung machen könnten.

Die normale Entwicklung und Differenzierung der Myotome bei Keimen von *Triton alpestris* ist also vor allem gekennzeichnet durch den Übergang der Myoblasten in Myocyten infolge des Auftretens der Myofibrillen um den 5. Tag, ferner durch eine Kernvermehrung innerhalb der einzelnen Muskelzellen. Die Kernzahlen pro Muskelfaser nehmen bis zum Alter von 10 Tagen von ursprünglich 1 auf durchschnittlich 3 zu. Vor allem in bezug auf die Kernzahl, aber auch bezüglich Differenzierungsgrad besteht ein deutliches cranio-caudales Gefälle. Durch die enorme Zunahme der kontraktile Elemente nimmt der Volumenanteil der Kerne am Gesamtvolumen der Myotome trotz

steigender Kernzahl mit zunehmendem Alter ab. Die Myoblasten zeigen eine normale mitotische Kernvermehrung entsprechend der Mitoseaktivität anderer Gewebe. Nach dem Auftreten der Myofibrillen werden innerhalb der Myotome weiterhin Mitosen gefunden, wenn auch deutlich spärlicher als bei den Myoblasten. Der Aufbrauch der Dotterreserven verhindert nach zirka 2 Wochen die weitere Proliferation sämtlicher Gewebe.

B. Versuche mit mitoseblockierenden Substanzen

Keime von 1, 2, 5, 9 und 10 Tagen wurden während 48 Stunden in eine Lösung von Stilboestrol 1:200 000 gebracht und anschließend sofort fixiert. In einer weitem Serie wurden Keime am 8. und 10. Tag 96 Stunden in Stilboestrollösung behandelt und im Alter von 12 bzw. 14 Tagen fixiert.

In Übereinstimmung mit *Morger* [1956] beobachten wir bei kurz-dauernder Stilboestrolbehandlung nur geringe Veränderungen in den Myotomen. Die Querstreifung ist gegenüber gleichaltrigen Kontrollen schwächer sichtbar. Bei längerem Verweilen in Stilboestrol treten größere Vakuolen im Sarkoplasma der Myocyten (bei *Morger* als Myoblasten bezeichnet) auf. Gleichzeitig kann man eine Schwellung der Zellen feststellen. Es folgt dann eine Ablösung der Myocyten am caudalen Myoseptum, wobei die Zellen sich nach cranial zusammenziehen, die Kerne verformt und ineinander geschachtelt werden. Die Schädigung bevorzugt zuerst die lateralen Zellen eines Myotoms, während die medialen noch erhalten sind. Oft ist die Schädigung einseitig (Abb. 6–8).

Ergänzend zu den Befunden *Morgers* ergibt sich aus unsern Experimenten, daß die Vakuolen im Sarkoplasma bei unbehandelten Keimen ebenfalls auftreten, daß sie jeweils umgeben sind von einem Kranz pyroninaffiner Granula und daß wir sie als Dotterreste, sozusagen als Negativ der Dotterschollen zu betrachten haben. Dies deshalb, weil sie bei Versuchs- und Kontrollkeimen in dem Moment verschwinden, wo der Dotter vollständig aufgebraucht ist, also im Alter von zirka 13–14 Tagen. Als weitere toxische Veränderung durch Stilboestrol finden sich in den Myotomen große, fast zystische intrazelluläre Hohlräume, die sich über mehrere Zellen ausdehnen können (Abb. 5). Bei der Ablösung der Muskelzellen vom caudalen Myoseptum werden die medialen Zellen zuletzt betroffen. Alle Zellen fallen dann aus dem Myotom heraus, so daß dieses leer erscheint (Abb. 8).

Beim Vergleich der Stilboestrolschäden an verschiedenen Alters-

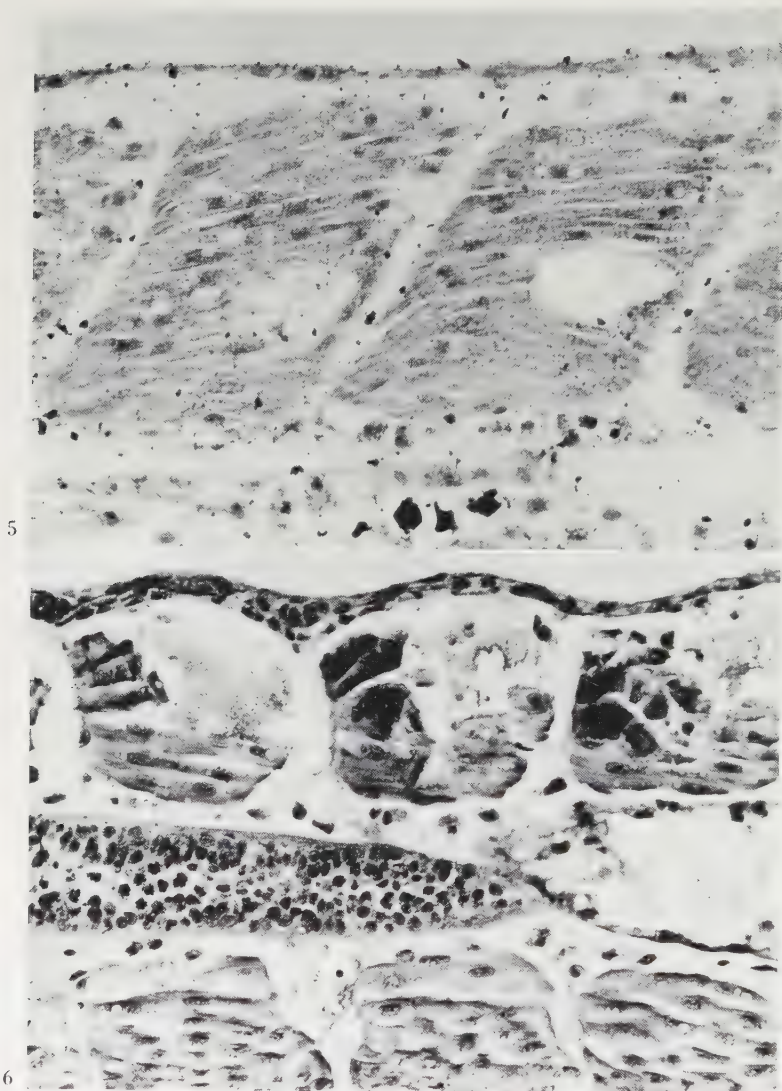


Abb. 5. 7 Tage alter Keim nach 48stündiger Stilboestrolbehandlung. Auftreten cystischer Hohlräume innerhalb der Myotome.

Abb. 6. 7 Tage alter Keim nach 48stündiger Stilboestrolbehandlung. Die Muskelzellen haben sich teilweise vom caudalen Myoseptum abgelöst und kontrahiert. Die Schädigung ist ausgesprochen unilateral.

stufen – wie sie hier im Gegensatz zu *Morger* zur Verfügung standen – ergibt sich ein Empfindlichkeitsmaximum für die Stilboestrolintoxikation um den 8. Tag. Beginnt die Behandlung zu dieser Zeit, so treten

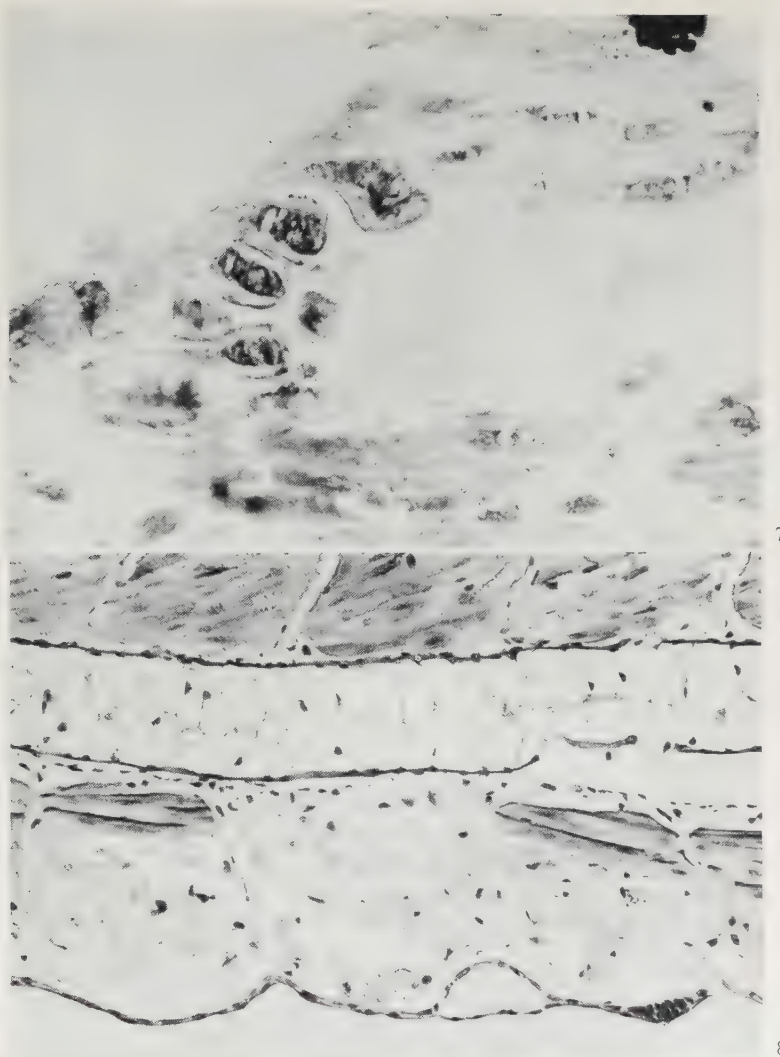


Abb. 7. 11 Tage alter Keim nach 48stündiger Stilboestrolbehandlung. Geldrollenartig zusammengeschachtelte Kerne innerhalb der abgelösten und kontrahierten Myocyten.

Abb. 8. 14tägiger Keim nach 96stündiger Stilboestrolbehandlung. Ausgesprochen unilaterale Schädigung. In einem Myotom sind die Zellen bereits vollständig zerstört, in den beiden anschließenden Myotomen sind die medial gelegenen Muskelzellen noch erhalten.

die größten Schäden auf. Die Phase wird dann überwunden, wahrscheinlich dadurch, daß Niere und Leber ihre Entgiftungsaufgabe übernehmen.

Die Stilboestrolwirkung auf die Myoblasten und Myocyten beschränkt sich nicht auf eine Alteration des Sarkoplasmas – wie *Morger* geglaubt hat – sondern die typische Mitosestörung, der Metaphasenstop, ist sehr wohl auch in der Muskulatur zu beobachten. Wir gehen aus von der Tatsache, daß Mitosen in der Muskulatur schon bei Normalkeimen zu finden sind. In den jüngsten Stadien entsprechen die Zahlen – wie erwähnt – der allgemeinen Mitoseaktivität der andern Gewebe, d.h. wir finden eine intensive mitotische Vermehrung der Kerne (Tabelle II, S. 222). Vom 5. Tag an sind die Mitosen zwar spärlicher, aber doch deutlich vorhanden (Abb. 4 und 9).

Nach Behandlung mit Triäthylenmelamin (TEM), welches die mitotische Kernteilung in der Interphase blockiert, findet sich nun tatsächlich keine einzige erkennbare Mitose mehr. Dies bei einer Expositionszeit von 24 bzw. 48 Stunden. Außer dem Verschwinden der Mitosestadien lassen sich dabei keine weiteren Veränderungen an den Keimen beobachten. Nicht einmal die sonst als charakteristisch beschriebene Kernschwellung konnten wir in der Muskulatur finden. Der durch TEM bedingte Mitoseblock hält bekanntlich lange Zeit an; man findet deshalb auch keine Mitosen bei Keimen, die nach 24 Stunden TEM-Behandlung zur Erholung noch 24 bzw. 96 Stunden im Wasser belassen und erst dann fixiert wurden.

Im Gegensatz dazu führt das Stilboestrol durch die Blockierung der Mitose auf dem Stadium der Metaphase zu einer deutlichen Steigerung der Zahl der beobachteten Teilungsfiguren (Tabelle III, Abb. 10).

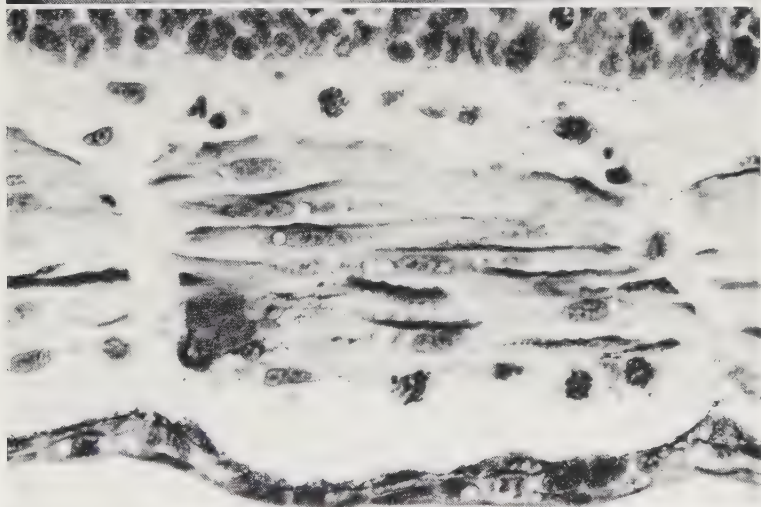
Tabelle III. Zahl der Mitosen in der Muskulatur und in der Retina in Abhängigkeit vom Alter. Erste Kolonne: Normalkeime, zweite Kolonne: Keime nach 48stündiger Behandlung mit Stilboestrol 1:200 000. Die Werte sind jeweils Durchschnittszahlen einer Serie gleichaltriger Keime

Alter bei Fixation	Mitosen (Muskulatur)		Mitosen (Retina)	
	normal	behandelt	normal	behandelt
3 Tage	183	378	nicht bestimmt	
4 Tage	286	464	nicht bestimmt	
7 Tage	19	83	349	641
11 Tage	70	204	391	817
12 Tage	55	118	384	676

Das prozentuale Verhältnis der Ablaufphasen bei den Zellteilungen bestätigt den Mitoseblock ebenfalls. Die 7- und 11tägigen Keime zeigen keine Ana- und Telophasen mehr, während die ältesten



9



10

Abb. 9. 12 Tage alter Kontrollkeim. In unmittelbarem Kontakt mit der Oberfläche der Muskelzellen ist eine kleinere, sich teilende Zelle sichtbar.

Abb. 10. 11 Tage alter Keim nach 48stündiger Stilboestrolbehandlung. Gehäufte Metaphasen im Grenzbereich eines Myotoms.

Keime offenbar am wenigsten durch Stilboestrol beeinflusst werden und ihre Kernteilungen mindestens teilweise weiterführen. Das Empfindlichkeitsmaximum scheint sich nicht bloß auf die Plasmanschäden zu beschränken, sondern betrifft auch die mitoseblockierende Wirkung des Stilboestrols (Tabelle IV).

Tabelle IV. Verhältnis der Stadien im Ablauf der Mitosen bei Versuchskeimen mit Stilboestrol in den verschiedenen Altersstufen. Vergleich der Werte in der Muskulatur und in der Retina

Lokalisation	Alter	Prophasen	Metaphasen	Anaphasen	Telophasen
Retina	7 Tage	1 %	99 %	0 %	0 %
	11 Tage	0 %	100 %	0 %	0 %
	12 Tage	4 %	76 %	11,5 %	8,5 %
Muskulatur	7 Tage	1,5 %	98,5 %	0 %	0 %
	11 Tage	0,5 %	99,5 %	0 %	0 %
	12 Tage	3,5 %	79,5 %	11 %	6 %

Die letzte Beobachtung konnte noch erhärtet werden durch Versuche mit 96stündiger Stilboestrolbehandlung. Bei Versuchsbeginn am 8. Tag (Empfindlichkeitsmaximum) ist der toxische Effekt dann so stark, daß am 12. Tag (Ende der Behandlung) praktisch keine Mitosen mehr zu finden sind, weil die Muskulatur dabei fast völlig zerstört ist. Beginnt dieselbe Behandlung am 10. Tag, so finden wir nach 96 Stunden eine viel schwächer geschädigte Muskulatur mit einer ganzen Anzahl von Mitosen, die zum Teil sogar wieder über die Metaphase hinaus weiterlaufen.

Bei den behandelten Keimen wurde ebenfalls der prozentuale Anteil der Kerne am Gesamtvolumen der Muskulatur mit Hilfe des Integrationsokulars geprüft. Aus Tabelle V ist ersichtlich, daß bei den

Tabelle V. Prozentualer Anteil der Kerne am Gesamtvolumen der vordern und hinteren Myotome in Abhängigkeit vom Alter. Erste Kolonne: Normalwerte, zweite Kolonne: Werte nach 48- bzw. 96stündiger Behandlung mit Stilboestrol 1:200 000. Auszählung von 250 Testpunkten. Prozentzahlen und statistische Fehler nach Nomogramm ermittelt

Alter (Tage)	Volumen% Kerne			
	Vordere Myotome		Hintere Myotome	
	normal	behandelt	normal	behandelt
		48 h Stilb.		48 h Stilb.
7	12,5 % ($\pm 1,4$)	11,2 % ($\pm 1,3$)	24,4 % ($\pm 1,9$)	22,8 % ($\pm 1,8$)
11	8,8 % ($\pm 1,2$)	13,6 % ($\pm 1,4$)	19,6 % ($\pm 1,7$)	24,8 % ($\pm 1,9$)
12	7,6 % ($\pm 1,1$)	18,4 % ($\pm 1,6$)	16,4 % ($\pm 1,6$)	26,8 % ($\pm 1,9$)
		96 h Stilb.		96 h Stilb.
12	7,6 % ($\pm 1,1$)	18,5 % ($\pm 1,6$)	16,4 % ($\pm 1,6$)	23,2 % ($\pm 1,8$)
14	4,8 % ($\pm 0,9$)	17,6 % ($\pm 1,6$)	12,4 % ($\pm 1,4$)	21,6 % ($\pm 1,7$)

Keimen, die 48 Stunden dem Stilboestrol ausgesetzt waren, der Anteil des Kernvolumens am Gesamtvolumen zunimmt. Dies, obwohl die Kernvermehrung blockiert ist! Eine oedematöse Kernschwellung kommt als Erklärung nicht in Frage. Aus den Resultaten geht vielmehr die differenzierungshemmende Wirkung des Stilboestrols deutlich hervor, welche bewirkt, daß der Anteil des Sarkoplasmas und der kontraktilen Elemente viel weniger zunimmt als bei Normalkeimen, so daß die Kerne schließlich einen relativ größeren Anteil am Gesamtvolumen ausmachen. (Die leeren Myotomanteile wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.)

Hinsichtlich der Kern-Plasmarelation bestätigt auch die 14tägige Altersstufe, welche 96 Stunden behandelt wurde, wiederum die Überwindung des Empfindlichkeitsmaximums, indem dort der Anteil der Kerne am Gesamtvolumen gegenüber den 12tägigen Keimen abnimmt, ähnlich wie bei den Kontrollkeimen. Die normale Differenzierung setzt sich also wieder durch.

IV. Diskussion

Ausgehend von Beobachtungen über den Einfluß männlicher und weiblicher Geschlechtshormone auf den Ablauf der Mitose in Fibroblastenkulturen haben *Töndury et al.* die Wirkung dieser Stoffe auf die Entwicklung von Amphibienkeimen untersucht. Unter den synthetisch gewonnenen oestrogenen Stoffen erwies sich das Stilboestrol als ganz besonders mitoseaktiv. So beschrieb *Schenk* [1950] den Einfluß des Stilboestrols auf die Gewebedifferenzierung bei *Triton alpestris*, und *Morger* lieferte 1956 einen weitem Beitrag über die Beeinflussung der Entwicklung und Differenzierung larvaler Organe des Alpenmolchs. In diesen Arbeiten fällt auf, daß das Stilboestrol einerseits in den Proliferationsmechanismus der Zellen, andererseits in die Differenzierung der Gewebe eingreift. Unsere Versuche haben gezeigt, daß diese beiden Effekte, deren möglicher innerer Zusammenhang ein interessantes physiologisch-chemisches Problem darstellt, auch bei der Entwicklung der Muskulatur von Tritonlarven beobachtet werden können. Sie äußern sich

1. in einer Differenzierungshemmung, wie sie für andere Gewebe und von *Morger* [1956] zum Teil auch bereits für die Muskulatur beschrieben wurde;
2. in einer Hemmung des Zellteilungsvorgangs in Form eines Mitoseblocks.

A. Die differenzierungshemmende und toxische Wirkung des Stilboestrols

Behandelt man Keime von *Triton alpestris* während 48 Stunden mit Stilboestrol (1:200 000), so ist der Effekt abhängig vom Entwicklungsstadium, d. h. es besteht ein Maximum der Empfindlichkeit um den 8. Tag nach der Befruchtung (s. S. 223 und 229). In allen Entwicklungsstadien kommt es zu einer deutlichen Verzögerung der Differenzierungsvorgänge, die in der Regel von regressiven Veränderungen im Cytoplasma begleitet ist. In den Myoblasten treten die Myofibrillen später auf und nehmen an Zahl und Dichte nur langsam zu. Im Zusammenhang damit erfährt auch die charakteristische Gliederung der Muskelzellen in einen peripheren, die Myofibrillen enthaltenden Anteil und einen axialen, sarkoplasmareichen, die Kerne, Vakuolen und Dotter einschließenden Abschnitt, eine Verzögerung. Die Myotome zeigen einen Zustand, den *Morger* [1956] als trübe Schwellung beschrieben hat, eine oedematöse Quellung, welche die Kerne, das Sarkoplasma und die Myosepten betrifft.

Morger berichtet im weitem von einer vakuolären Degeneration, die wir nach unsern Versuchen bezweifeln möchten. Vakuolen treten bei Normalkeimen ebenso häufig auf wie bei Versuchskeimen und stellen nach unserer Ansicht Negative von Dotterschollen dar, welche abgebaut wurden. In dieser Richtung weist auch der Kranz pyronin-affiner Granula, der sie jeweils umgibt (s. S. 223).

Als augenfälligster Stilboestrolschaden kann man schließlich eine Ablösung der einzelnen Myocyten von den Myosepten beobachten. Die Ablösung erfolgt zuerst am caudalen Myoseptum, ferner innerhalb des Myotoms von lateral nach medial. Nach der Lösung vom cranialen Myoseptum fallen die zusammengezogenen Myocyten aus dem Myotom heraus (Abb. 6–8). *Orsos* hat 1956 über Vitalreaktionen der Fetalzeit, insbesondere des Muskel- und Nervensystems berichtet. Er führt dabei aus, daß auf einen den physiologischen Grenzwert übersteigenden Reiz die Muskelfaser mit einer «katastrophalen Kontraktion» antwortet. *Orsos* glaubt, daß bei dieser irreversiblen Strukturänderung das Sarkoplasma mit seinem Myoglobingehalt eine Rolle spielt und nicht die Myofibrillen. *Töndury* [1962] hat im Rahmen seiner Untersuchungen virusbedingter Keimschädigungen beim Menschen über ähnliche Feststellungen in der embryonalen Muskulatur berichtet. Er beobachtete bei der Embryopathia rubeolica zusammengezogene Myocyten, deren Kerne geldrollenartig aufgereiht erschienen. Es scheint also, daß abgelöste kontrahierte Muskelzellen

unter den verschiedensten Bedingungen als toxischer Schaden in der embryonalen Muskulatur auftreten können.

Das verspätete Auftreten und die verminderte Ausdifferenzierung des Myofibrillenapparates führt zusammen mit der erwähnten Schädigung des Cytoplasmas zu einer Änderung der Kern-Plasma-relation in der Muskulatur der behandelten Keime. Mit Hilfe des Integrationsokulars haben wir versucht, auf Grund dieses Kriteriums den Grad der Differenzierungshemmung quantitativ zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 11 graphisch dargestellt.

Das cranio-caudale Entwicklungsgefälle zeigt sich im Unterschied zwischen den vordern und hintern Myotomen. Bei Normalkeimen nimmt der Volumenanteil der Kerne am Gesamtvolumen der Myotome mit steigendem Alter ab, bei behandelten hingegen zu, weil die Differenzierung des Sarkoplasmas und der Myofibrillen unter der Einwirkung des Stilboestrols gehemmt wird (vgl. S. 228-229).

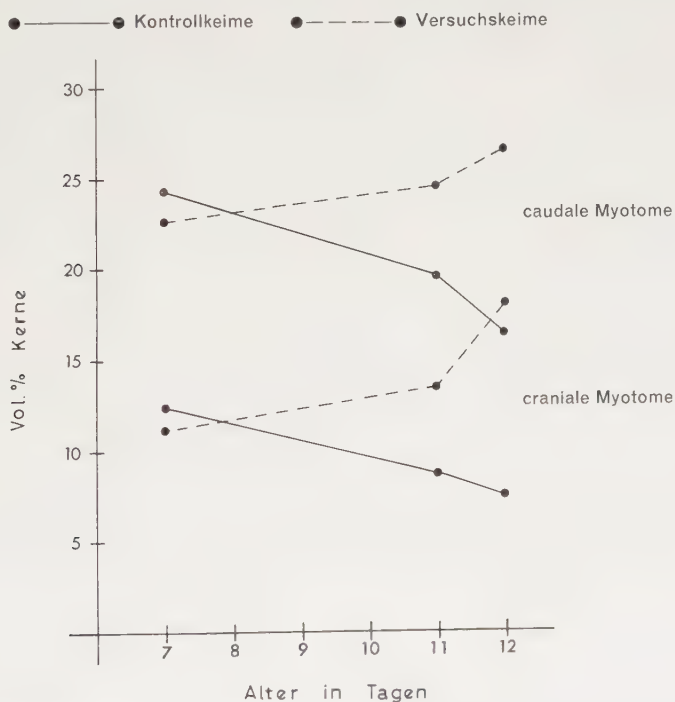


Abb. 11. Graphische Darstellung des Volumenanteils der Kerne am Gesamtvolumen der Myotome in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter. Vgl. die Werte aus Tabelle V. Kontrollkeime ausgezogen, behandelte Keime gestrichelt.

B. Mitoseblock

Die Auszählung der Mitosen innerhalb der Myotome behandelter und unbehandelter Keime zeigt, daß bei Normalkeimen ebenfalls – wenn auch spärlich – Mitosen vorkommen. Entsprechend äußert sich die Mitosehemmung durch das Stilboestrol bei den Versuchskeimen auch innerhalb der Myotome, so wie dies *Schenk* [1950] beschrieben hat. Es ist also keineswegs so, wie *Morger* [1956] gesagt hat, daß in den Myotomen kein Metaphasenstop beobachtet werden kann, nur sind die Mitosen nicht so häufig und nicht so augenfällig wie im neuralen Gewebe. Dieser Befund wird gestützt durch die Versuche mit TEM, bei denen, infolge der Arretierung des Teilungszyklus in der Interphase, tatsächlich keine Mitosestadien mehr angetroffen werden.

Das Auftreten der Mitosen innerhalb der Myotome kann grundsätzlich mit zwei Vorgängen zusammenhängen. Unbestritten ist die Mitoseaktivität in jungen Entwicklungsstadien als Ausdruck der Vermehrung der Myoblasten. Sie kommt in den Tabellen II und III in der hohen Mitoserate bei 3 und 4 Tage alten Keimlingen zum Ausdruck. Mit dem 4. Tag ist die Zellvermehrung innerhalb der Myotome praktisch abgeschlossen. Dagegen spielt sich in den zunächst einkernigen Myoblasten eine Kernvermehrung ab, über deren Mechanismus verschiedene Möglichkeiten zur Diskussion stehen. Unter diesen soll im folgenden die Vermehrung der Myoblastenkerne durch Amitosen, durch Mitosen und durch eine syncytiale Verschmelzung der Muskelzellen mit den Abkömmlingen undifferenzierter, vermehrungsfähiger Stammzellen besprochen werden.

Die *amitotische* Kernteilung ist eine der möglichen Erklärungen für die Entstehung vielkerniger Myocyten. Eine Kernvermehrung durch Amitose wird aber durch neuere Untersuchungen immer mehr in Frage gestellt. Die Theorie der Amitose steht und fällt mit der Definition des Amitosebildes, d.h. der histologischen Kernfigur, die als Amitose angesprochen wird. Aus diesem Grunde stellen die Amitosebilder, die man in den Präparaten von Muskelgewebe findet, laut *Stockdale* und *Holtzer* [1961] einfach eine Täuschung dar, die sich daraus erklärt, daß sich die Kerne im lebenden Gewebe fortwährend in Bewegung befinden und zwangsläufig Formänderungen durchmachen. Im Moment der Fixation kann sich dann ein Kern in einem Zustand befinden, der tatsächlich so aussieht, als ob sich eine Amitose abspiele. Bei *Hahn* [1957] ist diese, auf dem fixierten Schnittbild beruhende Definition der Amitose besonders klar ersichtlich. Die um-

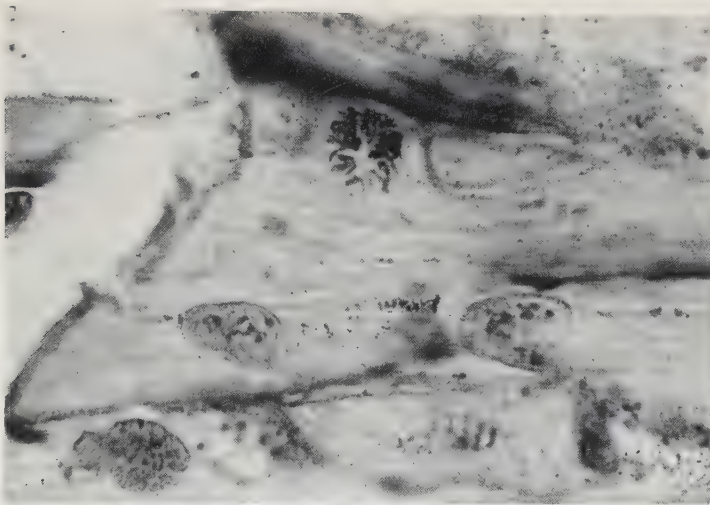
fassendste Darstellung all dessen, was bis anhin über die Amitose der tierischen und menschlichen Zelle bekannt ist, findet sich bei *Bucher* [1959]. Sollen nach einer Amitose wieder diploide Kerne entstehen, so muß es vorher zu einer Endoreplikation des Genmaterials kommen, d. h. zu einer Tetraploidie. Sowohl tetraploide als auch haploide Kerne sind in der Feulgenfärbung erkennbar. *Bassleer* [1963] hat dazu histophotometrische Messungen beim Hühnchenkeim durchgeführt und lehnt auf Grund seiner Resultate die Amitose als Kernvermehrungsmodus bei der Muskulatur völlig ab. Es konnte ferner gezeigt werden, daß im embryonalen Organismus die Potenz der mitotischen Teilung auch in den Kernen ausdifferenzierter Muskelzellen erhalten bleibt, denn sie können sich nach Verletzungen wieder zu Myoblasten entdifferenzieren und zur Regeneration der Muskulatur beitragen (*Holtzer, Lash, Swift* [1957]; *Holtzer* [1958]; *Holtzer, Abbot, Cavanaugh* [1959]; *Walker* [1963]). Da nach einer Amitose die Tochterkerne genetisch keinesfalls mehr gleich wie der Mutterkern sind, wäre nachfolgend eine normale Mitose gar nicht möglich. Die Potenz zur Entdifferenzierung und Regeneration unter mitotischer Teilung spricht also ebenfalls gegen die Amitosetheorie.

Auch gegen die Annahme einer *mitotischen* Kernteilung als Grundlage der Kernvermehrung innerhalb der Muskelzellen sind schwerwiegende Einwände erhoben worden. *Stockdale* und *Holtzer* [1961] haben nachgewiesen, daß Kerne, welche kontraktile Proteine synthetisieren, nicht imstande sind, die Verdoppelung des DNS-Bestandes vorzunehmen. Andererseits können Kerne während der DNS-Verdoppelung keine kontraktilen Proteine synthetisieren. Da eine Mitose ohne DNS-Verdoppelung nicht möglich ist, glauben die beiden Forscher nicht an eine mitotische Teilung von Kernen ausdifferenzierter Myocyten. Es bestünde hier natürlich die Möglichkeit, daß eine Art Arbeitsteilung zwischen den Kernen stattfindet, indem einige ihre Vermehrungsfähigkeit behalten, andere an der Synthese der kontraktilen Elemente beteiligt sind. Es wäre dann aber anzunehmen, daß strukturell und biochemisch zwischen diesen Kernen doch so weitgehende Unterschiede bestehen sollten, daß sie sich optisch oder in der Färbbarkeit irgendwie unterscheiden lassen müßten. Dies ist in unseren Versuchen nirgends der Fall und auch in der Literatur nicht beschrieben.

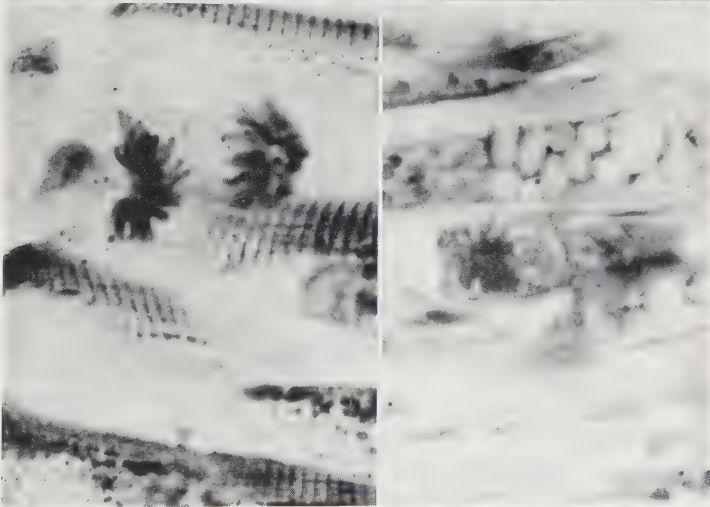
Die Theorie der *Zellfusion* ist in den vergangenen Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt, nicht nur weil gegen die andern Erklärungen ziemlich schwerwiegende Zweifel geäußert wurden, son-

dern weil sehr genaue Untersuchungen mit Zellkulturen vorliegen, auf Grund deren Resultate die Zellfusion als die einzige Möglichkeit der Entstehung vielkerniger Myocyten angesehen wird (*Capers* [1960]; *Holtzer* [1958-1962]; *Konigsberg* [1960]; *Bassleer* [1963] u. a.). Es handelt sich also nicht um eine Erklärung per exclusionem, sondern um eine experimentell fundierte Theorie.

Innerhalb unserer Versuchsreihen war bei den mit Stilboestrol behandelten Keimen eine deutliche Anhäufung gestoppter Metaphasen in den Myotomen festzustellen. Bis zum 5. Tag der Entwicklung handelt es sich dabei überwiegend um Zellteilungen, die Ausdruck der Vermehrung der Myoblasten sind. Mit dem 5. Tag geht die Mitoserate innerhalb der Myotome zurück. Zeitlich fällt dieser Rückgang mit dem Auftreten kontraktile Proteine in den Myoblasten zusammen. Mitosen werden aber auch nach diesem Zeitpunkt noch in ganz beträchtlicher Zahl angetroffen. Sie können an sich Ausdruck der Vermehrungstätigkeit ganz verschiedener Zellen sein. In Frage kommen Kerne von in Differenzierung begriffenen Muskelzellen, Kerne, die noch undifferenzierten Myoblasten angehören und schließlich Kerne von Bindegewebezellen oder Gefäßwandbestandteilen. Wir haben uns bemüht, die Lokalisation der Mitosen möglichst genau abzuklären. Teilungsfiguren im Zentrum einer ausdifferenzierten Muskelzelle kamen nie zur Beobachtung. Proliferierende Mesenchymzellen und Zellen in Gefäßsprossen wurden in der Umgebung der Myotome recht häufig angetroffen. Innerhalb der Myotome spielen sich die Kernteilungen in der überwiegenden Anzahl in Zellen ab, die sich in unmittelbarem Kontakt mit Myocyten befinden (Abb. 9). Bei der Untersuchung mit schwacher Vergrößerung scheint ein großer Teil der Metaphasen im Innern von Muskelzellen zu liegen (Abb. 10 und 12). Bei einer genauen Überprüfung zeigt sich aber, daß der in Teilung begriffene Kern von einer eindeutig begrenzten, ihm zugeordneten Cytoplasmahülle umgeben ist. Besonders deutlich wird dies, wenn in der Spätphase der Mitose die Teilung des Zelleibes einsetzt (Abb. 13). Wir betrachten diese, in engem Kontakt mit ausdifferenzierten Myocyten sich teilenden Zellen als eine Art undifferenzierte Stammzellen. Cytologisch gleichen sie jungen Myoblasten, synthetisieren noch keine kontraktile Proteine und sind deshalb zur DNS-Replikation und damit zur mitotischen Teilung durchaus noch fähig. Wir nehmen an, daß die Abkömmlinge dieser Zellen mit bereits bestehenden Myocyten verschmelzen oder selbst zu jungen ein- bis zweikernigen Muskelzellen auswachsen. Auf diese Weise erklärt sich die innerhalb der ersten



12



13

Abb. 12. Typische gestoppte Metaphase in einem stilboestrolbehandelten Keim.
Abb. 13. Myoblastenteilung innerhalb ausdifferenzierter Muskulatur bei unbehandelten Keimen, links nach 8 Tagen, rechts nach 10 Tagen Entwicklungszeit. Die Begrenzung der sich teilenden Zellen ist bei starker Vergrößerung in den Originalpräparaten deutlich sichtbar.

Wochen der Keimentwicklung beobachtete Zunahme der Kernzahl in der Muskulatur. Bei den beschriebenen Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte, vermehrungsfähige Reservezellen, wie sie als «resting cells» im Epithel der Hodenkanälchen regelmäßig angetroffen werden.

Wir schließen aus diesen Beobachtungen, daß bis zum Auftreten kontraktiler Proteine, d. h. bis zirka zum 5. Tag, die Myoblasten sich rein mitotisch teilen. Diese können sich zu ein- oder zweikernigen Muskelzellen differenzieren; ein Teil von ihnen bleibt aber Myoblasten und teilt sich weiter. Letztere können später mit bereits ausdifferenzierten Muskelzellen fusionieren und auf diese Weise vielkernige Zellen bilden.

Innerhalb eines Keimlings werden die beschriebenen Verhältnisse noch kompliziert durch das cranio-caudale Entwicklungsgefälle. Das Längenwachstum geht mit einer Vermehrung der Anzahl der Myotome einher, die, ausgehend vom sogenannten Schwanzknospenblastem, zur Entwicklung kommen. Da es sich bei den caudalen Myotomen um relativ kleine Elemente handelt, bestehen sie überwiegend aus ein- bis zweikernigen Muskelzellen. Auch sie machen im Laufe des weiteren Wachstums eine Größenzunahme durch, wobei die Vermehrung der Kernzahl an die Fusion mit Abkömmlingen solcher «resting cells» gebunden ist. Hinsichtlich des Dickenwachstums der Myotome scheint ein von lateral nach medial gerichtetes Gefälle zu bestehen. Eine gewisse Häufung von Mitosestadien an der lateralen Peripherie der Myotome spricht in diesem Sinne.

Die Synthese der kontraktilen Proteine in den Myoblasten beginnt nach Ogawa [1962] nicht früher als zirka 5–7 Tage nach der Befruchtung (Untersuchungen an *Triturus pyrrhogaster* BOIE bei einer Temperatur von 18 Grad Celsius). Die von uns verwendeten Keime von *Triton alpestris* waren bis zum 5. Tag noch völlig unbeweglich. Entsprechend fanden sich auf den Schnitten ausschließlich Myoblasten und noch keine Muskelzellen. Erst mit dem 5. Tag begann die Querstreifung aufzutreten, wobei man den Eindruck hat, daß sie nicht über die ganze Ausdehnung der Zellen gleichmäßig in Erscheinung tritt. Morger hat 1956 schon angegeben, daß sie am Ende der Myoblasten früher sichtbar wird als in der Mitte. Die Myofibrillen sind zuerst als eine feine Längsstreifung erkennbar. Erst etwas später erscheint das charakteristische Querstreifungsmuster. Ogawa [1962] hat gefunden, daß bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur das Actin immer vor dem Myosin synthetisiert wird. Dieser Befund erklärt zwanglos die bei der Reifung der Myofibrillen im Lichtmikroskop erfaßbaren Differenzierungsstufen.

Mit der Erschöpfung des Dottervorrates am 14. Tag haben wir unsere Versuche abgebrochen; eine Weiterführung wäre nur mit geeigneten Fütterungsmethoden möglich. Zweifellos stellt auch die

Metamorphose im Hinblick auf die Weiterentwicklung der Skelettmuskulatur interessante Probleme.

Zusammenfassung

Die Wirkung von Cytostatica, insbesondere von Stilboestrol und Triäthylmelamin auf die larvale Entwicklung der Myotome von *Triton alpestris* wurde während den ersten zwei Wochen der Entwicklung untersucht. Stilboestrol hemmt in einer Konzentration von 1:200 000 die Differenzierungsvorgänge in den Myoblasten und unterbindet die mitotische Kernvermehrung auf dem Stadium der Metaphase. In den Myoblasten erscheint die Produktion der Myofibrillen gehemmt, die Kern-Plasmarelation ist zugunsten der Zellkerne verschoben. Bei schwerer Schädigung lösen sich die Muskelzellen von den Myosepten ab und zerfallen. In Übereinstimmung mit dem physiologischen cranio-caudalen Entwicklungsgefälle äußert sich die Schädigung in den vordern und hintern Körpersegmenten verschieden. Die Blockierung der Kernteilungen in der Metaphase hat eine Anhäufung der sonst selten anzutreffenden Kernteilungsfiguren innerhalb der Myotome zur Folge. Dabei handelt es sich aber nicht um eine mitotische Vermehrung von Kernen innerhalb ausdifferenzierter Muskelzellen, sondern offenbar um eine Teilung undifferenzierter Stammzellen, deren Abkömmlinge mit den Muskelzellen syncytial verschmelzen. Anhand dieser Befunde und auf Grund neuerer Literaturangaben werden die verschiedenen Auffassungen über die Entstehung der Vielkernigkeit der Skelettmuskelfasern besprochen.

Summary

The effect of cytostatics, especially stilbesterol and triethylenmelamin, is studied with respect to the larval development of the myotomes of *Triton alpestris* during the first two weeks of development. In a concentration of 1:200 000 stilbesterol inhibits the processes of differentiation in the myoblasts and arrests mitotic nuclear multiplication at the metaphase stage. In the myoblasts the production of myofibrils appears to be inhibited and the nucleus-plasma-relationship is displaced in favour of the cell nucleus. With more marked damage the muscle cells detach from the myosepta and degenerate. In accordance with the physiological cranio-caudal development-gradient, the damage manifests itself differently in the cranial and caudal body segments. The interruption of nuclear divisions during metaphase causes an accumulation of otherwise seldomly observed division figures within the myotomes. Moreover, we are not dealing with a mitotic multiplication of nuclei within differentiated muscle cells, but apparently with a division of undifferentiated primary (Stamm) cells, whose progeny fuse syncytially with the muscle cells. Due to these observations and on the basis of the latest literature, the various interpretations as to the origin of the multinucleated skeletal muscle fibers are discussed.

Résumé

Etude de l'action exercée par des agents cytostatiques, plus particulièrement du Stilboestrol et de la Triéthylène-mélanine, sur le développement larvaire des myotomes chez *Triton alpestris* au cours des deux premières semaines du développement. Le Stilboestrol, en concentration de 1:200 000, inhibe les processus de diffé-

rentiation des myoblastes et interrompt la division mitotique au stade de la métaphase. La formation de myofibrilles est inhibée dans les myoblastes, le quotient nucléo-plasmatique est modifié en faveur du noyau. Dans les altérations graves, les cellules musculaires se détachent des septa et dégèrent. Les processus dégénératifs sont différents selon que l'on envisage les segments antérieurs ou les segments postérieurs du corps, ce qui correspond aux phénomènes physiologiques du développement cranio-caudal. L'arrêt des mitoses en métaphase entraîne une accumulation de cinèses dans les myotomes alors que normalement elles sont rarement visibles à ce niveau. Il ne s'agit toutefois pas d'une augmentation mitotique du nombre des noyaux dans des cellules musculaires en voie de différenciation, mais vraisemblablement d'une division de cellules-souches non-différenciées, dont les cellules-filles fusionnent avec des cellules musculaires. En se basant sur ses observations, et sur les données récentes de la littérature, l'auteur passe en revue les diverses opinions qui existent sur la formation de cellules musculaires multinucléées.

LITERATUR

- Ankel, W. E.; Bernet, H. S.; Ebert, J. D.; Herrmann, H.; Holtzer, H.; Metz, C. B.; Moscona, A.; Porter, K. R. and Ranzi, S.: Myogenesis, fibrogenesis; in «Cytodifferentiation», ed. by D. Rudnick, pp. 48–73 (University of Chicago Press 1958).
- Bassler, R.: Etude de l'augmentation du nombre de noyaux au cours de la myogénèse *in vitro*. C. R. Ass. Anat. 48: 229–237 (1963).
- Bucher, O.: Die Amitose der tierischen und menschlichen Zelle. Protoplasmatologia, vol. VI/E1 (Springer, Wien 1959).
- Capers, C. R.: Multinucleation of skeletal muscle *in vitro*. J. biophys. biochem. Cytol. 7: 559–566 (1960).
- Hahn, R.: Untersuchungen über das Vorkommen von Amitosen in embryonalem Gewebe; med. vet. Diss. München (1957).
- Hennig, A.: Messen und Zählen in der Mikroskopie. Zeiss Werkschr. 30 (1958).
- Holtzer, H.: The development of mesodermal axial structures in regeneration and embryogenesis; in «Regeneration in Vertebrates», ed. by Ch. S. Thornton, pp. 15–33 (University of Chicago Press 1958). – Some further uses of antibodies for analyzing the structure and development of muscle. Exp. Cell Res. Suppl. 7: 234–243 (1959). – Aspects of chondrogenesis and myogenesis; in «Synthesis of Molecular and Cellular Structures», ed. by D. Rudnick, pp. 53–87 (Ronald Press New York 1961).
- Holtzer, H.; Abbot, J. and Cavanaugh, M. W.: Some properties of embryonic cardiac myoblasts. Exp. Cell Res. 16: 595–601 (1959).
- Konigsberg, I. R.: The differentiation of cross-striated myofibrils in short term cell culture. Exp. Cell Res. 21: 414–420 (1960).
- Lash, J. W.; Holtzer, H. and Swift, H.: Regeneration of mature skeletal muscle. Anat. Rec. 128: 679–698 (1957).
- Marshall, J. M.; Holtzer, H.; Fink, H. and Pepe, F.: The distribution of protein antigens in striated myofibrils. Exp. Cell Res. Suppl. 7: 219–233 (1959).
- Morger, R.: Beitrag zur Kenntnis der Wirkung von Stilboestrol auf Wachstum und Differenzierung larvaler Organe von *Triton alpestris*; med. Diss. Zürich (1956).
- Ogawa, Y.: Synthesis of skeletal muscle proteins in early embryos and regenerating tissue of chick and triturus. Exp. Cell Res. 26: 269–274 (1962a). – Biochemical

- relation between actin and myosin syntheses during the differentiation of skeletal muscle tissue of triturus. *Exp. Cell Res.* 26: 526–533 (1962b).
- Orsos, F.: Über Vitalreaktionen der Fetalzeit, insbesondere des Muskel- und Nervensystems. *Verh. dtsch. Ges. Path.* 40: 166–172 (1956).
- Schenk, R.: Über die Beeinflussung der Eientwicklung durch weibliche Sexualhormone. Der Einfluß von Oestradiol und Stilboestrol auf die Gewebedifferenzierung bei *Triton alpestris*. *Roux' Arch. EntwMech.* 144: 448–475 (1950). – Über Regenerationsvorgänge am Auge junger Tritonlarven nach partieller Zerstörung der Retina durch Stilboestrol. *Anat. Anz.* 99: Erg. H. 348–353 (1952).
- Schenk, R. und Töndury, G.: Der Einfluß von Cytostatica auf Wachstum und Differenzierung der Linsen larvaler Tritonaugen. *Acta anat.* 30: 725–738 (1957).
- Stockdale, F.E. and Holtzer, H.: DNA-synthesis and myogenesis. *Exp. Cell Res.* 24: 508–520 (1961).
- Töndury, G.: Embryopathien. Über die Wirkungsweise (Infektionsweg und Pathogenese) von Viren auf den menschlichen Keimling (Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1962).
- Walker, B.E.: The origin of myoblasts and the problem of dedifferentiation. *Exp. Cell Res.* 30: 80–92 (1963).

Eingegangen 26. Juni 1965

Adresse des Autors: Dr. Brian Spindler, Anatomisches Institut der Universität, 4000 Basel (Schweiz)

